

Cry1Ac 基因载体构建及其在枯草芽孢杆菌中的杀虫活性表达

刘济宁^{1,2}, 刘贤进^{1*}, 余向阳¹, 彭正强²

(1. 江苏省农业科学院, 南京 210014; 2. 中国热带农业科学院, 海南儋州 571737)

摘要:根据苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* HD-73 基因 *Cry1Ac* 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 木糖诱导型启动子 *PxylR* 序列, 分别设计 2 对特异引物 *Cry1AcF/R* 和 *PxyF/R* 扩增获得了完整的启动子 *PxylR* 和 *Cry1Ac* 基因序列, 进一步以上述产物混合物为模板, 以 *PxyF/Cry1AcR* 作引物进行重迭 PCR, 获得了载体 *PxylR-Cry1Ac*, 经 *Sph* I 和 *Bam* H I 完全酶切后, 将 *PxylR-Cry1Ac* 插入大肠杆菌-苏云金芽孢杆菌穿梭载体 *pHT315*, 重组表达质粒 *pCry1Ac315* 转化枯草芽孢杆菌感受态细胞。工程菌株质粒酶切电泳分析、SDS-PAGE 电泳分析和杀虫生物活性测定结果证实了 *Cry1Ac* 基因的导入及其在枯草芽孢杆菌 JAAS01D 中的有效表达。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 枯草芽孢杆菌; 重迭 PCR; *Cry1Ac* 基因; 杀虫活性

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)03-0342-05

Construction of recombinant plasmid carrying *Cry1Ac* gene and expression of insecticidal activities in *Bacillus subtilis*

LIU Ji-Ning^{1,2}, LIU Xian-Jin^{1*}, YU Xiang-Yang¹, PENG Zheng-Qiang² (1. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: The full length sequence of the promoter and *Cry1Ac* gene were obtained by PCR with two pairs of unique primers *Cry1AcF/R* and *PxyF/R* respectively, which were designed according to the *Cry1Ac* gene and promoter sequence of xylase operon from *Bacillus subtilis* 168. Then, the fused translational expression vector *PxylR-Cry1Ac* was constructed using overlapping PCR technique with the primers pair *PxyF/Cry1AcR* and the mixture of above PCR production. After being digested by *Sph* I and *Bam* H I, *PxylR-Cry1Ac* expression vector was inserted into *E. coli*-*B. thuringiensis* shuttle vector *pHT315*, and the resulted recombinant plasmids were named as *pCry1Ac315*. The recombinant plasmids were transferred into *B. subtilis* laboratory strain JAAS01D. Efficient expression of the *Cry1Ac* gene in the engineered JAAS01D-1Ac was proved with restriction enzyme analysis, SDS-PAGE electrophoresis analysis and insecticidal activity assay.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus subtilis*; overlapping PCR; *Cry1Ac* gene; insecticidal activity

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 能产生对害虫专一性毒杀作用的晶体蛋白, 且对环境安全, 是目前国内外应用最为广泛的杀虫微生物。该杀虫蛋白是由 *Cry* 基因编码, 通过现代生物技术将 *Cry* 基因导入植物根际、叶面和内生细菌构建的新型工程菌具有杀虫、防病、固氮和增产等多种功能 (Schnepe *et al.*, 1998)。枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* JAAS01D 是从中国海域分离出的一株对多种鳞翅目害虫具有杀虫活性的海洋细菌, 研究表明该菌株对小菜蛾 *Plutella xylostella* 杀虫活性较低, 为了提高

JAAS01D 的杀虫活性、扩大杀虫谱、延迟害虫的抗药性。本研究以枯草芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭质粒为载体, 通过将对小菜蛾具有高效的 *Cry1Ac* 基因 (Shivakumar, 1986) 导入 JAAS01D, 成功构建了杀虫工程菌株。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

本研究所用菌株与质粒见表 1。

基金项目: 国家“863”项目(2002AA244041); 江苏省自然科学基金项目(BK2003117)

作者简介: 刘济宁, 男, 1977 年 9 月生, 河北辛集人, 硕士, 从事海洋微生物新型农药研究

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: jaasliu@jaas.ac.cn

收稿日期 Received: 2004-06-01; 接受日期 Accepted: 2004-08-04

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株与质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristics	来源 Source
菌株 Strains		
<i>Escherichia coli</i> JM110	受体菌 <i>dam</i> <i>dcm</i> <i>supE44</i> <i>hsdR17</i> <i>thi</i> <i>leu</i> <i>rpsL</i> <i>lack</i> <i>galK</i> <i>galT</i> <i>ara</i> <i>tonA</i> <i>thr</i> <i>tsXΔ</i> (<i>lac</i> - <i>proAB</i>)F [<i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lacI^q</i> <i>lacZΔM15</i>]	本实验室 This laboratory
<i>Bacillus subtilis</i> JAAS01D	野生型 Wild type	本实验室 This laboratory
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-73	野生型 Wild type	本实验室 This laboratory
质粒 Plasmids		
pHT315	大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 <i>E. coli</i> - <i>B. thuringiensis</i> shuttle vector , <i>Amp^R</i> <i>Er^R</i>	本实验室 This laboratory
pCry1Ac315	重组表达质粒 pHT315 carrying 3 537 bp <i>Cry1Ac</i> in <i>BamH I</i> / <i>Sph I</i> sites	本研究 This research
pHT315xylR	携带 <i>PxylR</i> 序列 pHT315 carrying promoter <i>PxylR</i>	巴斯德研究所 Institute Pasteur

1.2 培养基、抗生素与试剂

枯草芽孢杆菌感受态细胞培养基为 MD 与 MDCH 培养基 (Harwood and Cutting , 1990 ; 姚震声等 , 2003)。枯草芽孢杆菌和大肠杆菌培养用 LB 培养基 (Msadek *et al.* , 1998)。限制酶、T₄ DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒、Taq plus DNA 聚合酶购自大连宝生物工程公司 ,PCR 引物由上海生物工程公司合成。氨苄青霉素购自南京科威生物工程公司 , 使用浓度为 100 μ g/mL。

1.3 重迭 PCR 扩增

根据 *Cry1Ac* 基因 (Crikmore , 2002) 和枯草芽孢杆菌木糖诱导启动子 *PxylR* 序列 , 分别设计 2 对特异性引物 *Cry1AcF/R* 和 *PxyF/R* , 并在 *Cry1Ac* 下游引物和 *PxylR* 上游引物分别引入 *BamH I* 和 *Sph I* 酶切位点 , 并使 *Cry1Ac* 上游引物和 *PxylR* 下游引物中 *Cry1Ac* 起始密码子与 *PxylR* 正确连接。

PxyF (*Pxyl* 上游) : 5'-CACATGCATGCCATGT CACTGTTGCTTCAG-3' (下划线表示 *Sph I* 酶切位点) ; *PxyR* (*Pxyl* 下游) : 5'-GTTCCGATTGTTATCCAT GTGATTTCCTCTTA-3'。 *Cry1AcF* (*Cry1Ac* 上游) : 5'-TAAGGGGGAAATCAC ATGGATAACAATCCGAAC-3' ; *Cry1AcR* (*Cry1Ac* 下游) : 5'-GGGGATTCCCTTACAAG TAAAGCATATA-3' (下划线表示 *BamH I* 酶切位点)。

第 1 次扩增以 *PxyF/R* 为引物 ,pHT315xylR 为模板 ,94℃ 30 s ,55℃ 30 s ,72℃ 2 min , 共 34 个循环 , 扩增得到 1.5 kb 的 *PxylR* 片段 ; 第 2 次扩增以 *Cry1AcF/R* 为引物 ,pCry1Ac315 质粒为模板 ,94℃ 30 s ,55℃ 30 s ,72℃ 2.5 min , 共 34 个循环 , 扩增得

到 3.8 kb 的 *Cry1Ac* 片段 ; 以 *PxyF/Cry1AcR* 作引物进行第 3 次 PCR 扩增 , 反应参数为 94℃ 30 s ,55℃ 30 s ,72℃ 3 min , 共 34 个循环 , 得到 5.3 kb 的载体 *PxylR-Cry1Ac*。

1.4 质粒提取、DNA 酶切、片段回收、连接及遗传转化

苏云金芽孢杆菌质粒 DNA 提取按 Gonzalez 等 (1981) 方法 , 枯草芽孢杆菌感受态细胞制备、遗传转化和质粒提取按 Harwood 和 Cutting (1990) 方法 ; 大肠杆菌质粒提取、DNA 酶切、片段回收、连接及遗传转化采用常规方法 (Sambrook *et al.* , 1989)。

1.5 杀虫蛋白的 SDS-PAGE 分析

本研究采用 10% 凝胶 , 配制方法按 Shivakumar (1986)。取 3 mL 重组质粒的枯草芽孢杆菌菌液离心收集菌体 , 加入 100 μ L 纯水 ,25 μ L 新配 0.5 mol/L NaOH ,25℃ 作用 5 min , 加入 65 μ L 4 × 样品缓冲液 (925 μ L 上样缓冲液 + 75 μ L β -巯基乙醇) ,100℃ 煮沸 5 min。离心除去沉淀 , 取 25 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳。120 V 恒压电泳 2 h , 停止电泳 , 取下胶用蒸馏水轻轻漂洗 30 s。凝胶在染色液中染色 8 h , 脱色液中脱色 3 h , 在清水中漂洗至蛋白带清晰。

1.6 工程菌株杀虫生物活性检测

工程菌株及其对照接种 LB 液 , 培养 3 天 , 以菌液 : 水 : 人工饲料为 1:9:10 的比例配置饲料接入玉米螟试虫后 ,28℃ 培养 6 天调查结果 ; 以菌液浸泡甘蓝叶片约 30 s , 自然晾干后接入小菜蛾和甜菜夜蛾试虫 ,25~26℃ 培养 48 h 和 96 h 调查结果 ; 以无菌水为对照 , 所有试虫均为 3 龄幼虫。如对照有死亡 ,

用 Abbott 公式校正死亡率。

2 结果与分析

2.1 重迭 PCR 构建载体 *PxylR-Cry1Ac*

以质粒 pHT315xylR 为模板, *Pxy*F/R 为引物, 经 PCR 扩增获得了 1.5 kb 的 *PxylR* 片段(图 1); 以 pCry1Ac315 质粒为模板, *Cry1Ac*F/R 为引物, 经过扩增得到 3.8 kb 的 *Cry1Ac* 片段(图 2)。由于 *PxylR* 下游引物与 *Cry1Ac* 上游引物互补, 这两步得到的 PCR 产物必然有一段重复序列, 所以以上述扩增产物混合物为模板, 以 *Pxy*F 和 *Cry1Ac*R 为引物

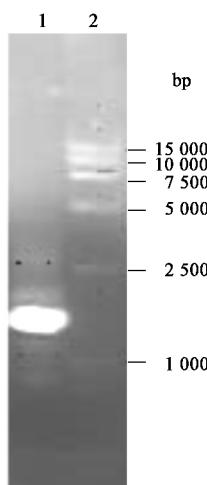


图 1 *PxylR* 的 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis of PCR *PxylR*

1. PCR 产物 PCR production of promoter *PxylR*;
2. 分子量标准 Marker (DL15000).

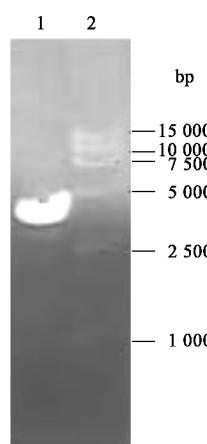


图 2 *Cry1Ac* 的 PCR 产物电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis of PCR *Cry1Ac*

1. PCR 产物 PCR production of *Cry1Ac*;
2. 分子量标准 Marker (DL15000).

(*PxylR* 的上游引物和 *Cry1Ac* 的下游引物) 进行 PCR 扩增得到了约 5.3 kb 的 *PxylR-Cry1Ac* 表达片段(图 3)。

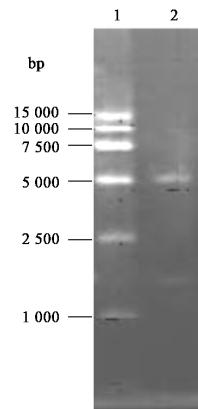


图 3 重迭 PCR 产物电泳分析

Fig. 3 Electrophoresis of overlapping PCR products

1. 分子量标准 Marker (DL15000);
2. PCR 产物 PCR production of *PxylR-Cry1Ac*.

2.2 载体 pCry1Ac315 的构建

将 PCR 扩增获得的 *PxylR-Cry1Ac* 用 *Bam*H I 和 *Sph* I 双酶切, 再与相应酶切的大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pHT315 连接, 转化大肠杆菌 JM110, 提取重组子质粒, 限制性酶切电泳分析后, 转化枯草芽孢杆菌标准菌株 168, 结合抗性标记和生物活性测定筛选得到重组质粒 pCry1Ac315。重组质粒 pCry1Ac315 构建流程和酶切分析鉴定见图 4、图 5。

2.3 杀虫蛋白的 SDS-PAGE 分析

将重组工程菌株 JAAS01D-1Ac 表达产物进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 6。工程菌株 JAAS01D-1Ac 有一条明显的 130 kD 蛋白带, 表明 *Cry1Ac* 在 JAAS01D 中的有效表达。

2.4 工程菌株杀虫生物活性检测

JAAS01D 工程菌和 Bt HD-73 分别接种 LB 培养液 28℃, 12 000 × g 约 72 h, 分别测定它们的杀虫活性(表 2)。结果表明, 工程菌菌株 JAAS01D-1Ac 对小菜蛾、甜菜夜蛾和欧洲玉米螟的杀虫活性分别为 71.1%、56.7% 和 88.9%, 比 JAAS01D 的杀虫活性均有所提高。

3 讨论

利用现代生物技术构建高效杀虫微生物是生物防治研究的热点领域, 国内外许多实验室都进行了多方面积极的探索。本研究采用重迭 PCR 构建重组质粒方法简单、易于操作, 通过引物设计确保

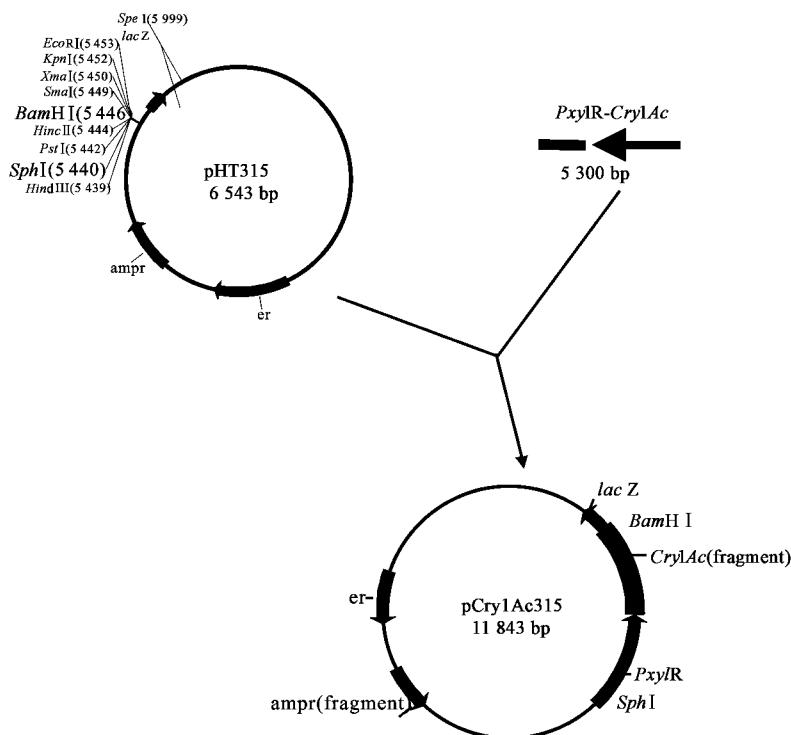


图 4 携带 *PxyLR-Cry1Ac* 重组质粒 pCry1Ac315 的构建

Fig. 4 Construction of recombinant plasmids pCry1Ac315 carrying *PxyLR-Cry1Ac* element

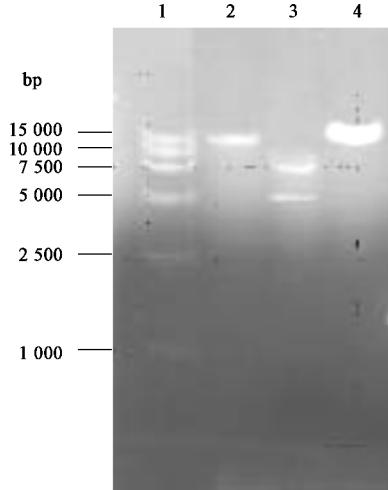


图 5 重组质粒 pCry1Ac315 的酶切鉴定

Fig. 5 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pCry1Ac315

1. 分子量标准 Marker (DL15000) ; 2. pCry1Ac315/BamH I ;
3. pCry1Ac315/Sph I /BamH I ; 4. pCry1Ac315.

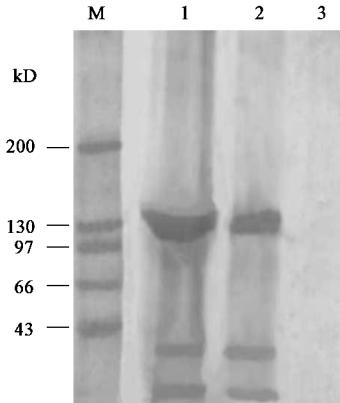


图 6 工程菌株表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of engineered strains
M: 分子量标准 Marker ; 1. HD-73 ;
2. JAAS01D-1Ac ; 3. JAAS01D.

Cry1Ac 的开放阅读框与启动子读码框的准确的连接。为了避免 PCR 引起的错配,首先采用 Taq plus DNA 高保真聚合酶进行 DNA 扩增,提取了多个重组克隆质粒转化枯草芽孢杆菌模式菌,通过酶切鉴定进一步筛选重组质粒。最后对筛选到的重组质粒进

行转化枯草芽孢杆菌模式菌生物活性测定,证实了两个 DNA 组件的准确连接。同时将 *Cry1Ac* 和 *PxyLR* 通过限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sph* I 酶切,将他们与经过 *Bam*H I 和 *Sph* I 双切的 pHT315 混合,通过连接酶连接,转化 JM110,但是 3 个片段连接的

表 2 工程菌株对 3 种害虫的生物活性

Table 2 Insecticidal activity of engineered strains against three pests

试虫 Test insect	菌株 Strains	试虫数 Larva number	重复 Repeats	校正死亡率 Correct mortality(%)
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	JAAS01D	30	3	16.7
	JAAS01D-1Ac	30	3	71.1
	HD-73	30	3	95.6
甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i>	JAAS01D	30	3	5.6
	JAAS01D-1Ac	30	3	56.7
	HD-73	30	3	68.4
欧洲玉米螟 <i>Ostrinia furnacalis</i>	JAAS01D	30	3	41.6
	JAAS01D-1Ac	30	3	88.9
	HD-73	30	3	100

效率很低,自连现象很严重。

本研究首先选择了大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pHT315 作为 *PxylR-Cry1Ac* 的筛选载体,通过它将 *PxylR-Cry1Ac* 转化 JM110,再提取转化 BS168 标准菌株,通过 SDS-PAGE 电泳和生物活性测定获得了表达正确的表达载体;但是重组子转化 JAAS01D 目标菌株时发生困难,说明载体存在缺陷,所以选择合适的载体成为下一步工作的重点。

参考文献(References)

Crikmore N, 2002. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature (<http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crikmore/Bt/index.html>).

Gonzalez JM, Dulamage HT, Carlton BC, 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 5: 351–365.

Harwood CR, Cutting SM, 1990. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd. Inc. UK.

Msadek T, Dartois V, Kunst F, Herbaud ML, Denizot F, Rapoport G, 1998. *ClpP* of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol. Microbiol.*, 27(5): 899–914.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N. Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 26–99.

Schnepe E, Crickmore N, Lereclus D, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 775–806.

Shivakumar AG, 1986. Vegetative expression of the δ -endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kustakii* in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 166: 194–204.

Yao ZS, Chen ZY, Chen ZY, Zheng XB, Zhang J, Huang DF, 2003. Genetically marking of natural biocontrol bacterium *Bacillus subtilis* strains with green fluorescent protein gene. *Chinese J. Biotechnology*, 19(5): 551–556. [姚震声, 陈中义, 陈志谊, 郑小波, 张杰, 黄大昉, 2003. 绿色荧光蛋白基因标记野生型生防枯草芽孢杆菌的研究. *生物工程学报*, 19(5): 551–556]

(责任编辑:黄玲巧)